

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/063968 A1

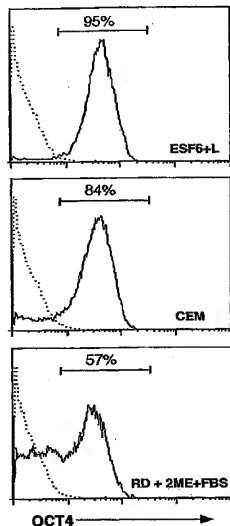
(51) 国際特許分類: C12N 5/06, 5/08  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019818  
(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 27 日 (27.12.2004)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願 2003-434035  
2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社  
ジーエスプラッツ (GS PLATZ CO., LTD.) [JP/JP];  
〒1030027 東京都中央区日本橋一丁目 7 番 1 1 号 日  
本橋東ビル Tokyo (JP).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 古江 美保 (FU-  
RUE, Miho) [JP/JP]; 〒2388580 神奈川県横須賀市  
稲岡町 8 2 神奈川県歯科大学・生体機能学講座・  
生化学分子生物学分野内 Kanagawa (JP). 岡本 哲治  
(OKAMOTO, Tetsuji) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島  
市南区霞 1-2-3 広島大学大学院・医歯薬学総合  
研究科・先進医療開発科学講座・分子口腔医学・顎  
顔面外科学内 Hiroshima (JP). 浅島 誠 (ASASHIMA,  
Makoto) [JP/JP]; 〒1538902 東京都目黒区駒場 3-  
8-1 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科  
学系内 Tokyo (JP).  
(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1006036  
東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 5 号 霞が関ビル  
3 6 階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: BASAL MEDIUM FOR ES CELL CULTURING

(54) 発明の名称: E S 細胞培養用基礎培地



(57) Abstract: A culture medium for serum-free medium that is capable of culturing ES cells for a prolonged period of time while retaining anaplasticity without the use of feeder cells; and a basal medium for production of such a culture medium. There is provided a basal medium characterized by having the composition of Table 1. There is further provided a culture medium for ES cells produced by this basal medium.

(57) 要約:

フィーダー細胞なしで、未分化性を維持したまま E S 細胞を長期に培養しうる無血清培地用の培地、およびこのような培地を製造するための基礎培地が開示される。本発明の基礎培地は表 I に示される組成を有することを特徴とする。また、この基礎培地により製造される E S 細胞用培地も開示される。

WO 2005/063968 A1



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,

BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## E S細胞培養用基礎培地

技術分野

- 5 本発明は哺乳動物のE S細胞を培養するための培地を調製するための基礎培地に関する。

背景技術

- 10 胚性幹（E S）細胞は未分化性を示し、生物の発生過程においてインビトロであらゆるタイプの分化した細胞を発生させる能力を有する。E S細胞の自己複製能および未分化性は、ウシ胎児血清を補充した培養用培地を用いて、フィーダー細胞またはL I Fの存在下で維持しうることが知られている（Zandstra, P.W., et al., Biotechnol Bioeng 69, 607-17 (2000)）。しかし、現在広く用いられているこのような培養条件においては、E S細胞の分化を解析する際にフィーダー細胞を確実に除去することが困難であり、分化誘導因子の添加による影響を正確に解析することができない。また、フィーダー細胞なしで培養しうるE S細胞株も知られているが、例えば、マウスE S細胞株の1つであるE S-D 3は、フィーダー層なしの培養条件下では自発的に分化する傾向にある。

- 15 さらに、血清は、アクチビンおよび線維芽細胞成長因子や未知の分化誘導因子の、その量の変動する成分を含む。これらの成分は、種々の物質を外から加えてE S細胞の細胞成長および分化を解析する際に、分析結果に影響を与える可能性がある。また、血清の使用はウイルス、プリオンや未知の因子などの感染の危険性があり、再生医療への応用の際にはリスクを伴う。また、E S細胞の無血清培養条件についての報告もあるが、数代継代すると神経などに分化し、未分化性が維持できない場合がある。
- 25

発明の開示

本発明は、フィーダー細胞なしで、未分化性を維持したままE S細胞を長期に培養しうる無血清培養用の培地、およびこのような培地を製造するための基礎培

地を提供することを目的とする。

本発明者らは、特定の組成を有する培地を用いることにより、フィーダー細胞および血清なしで、未分化性を維持したままES細胞を培養しうることを見いだした。すなわち、本発明は、以下の表I：

5

表I

| 成分                          | 濃度(mg/L)        | 成分                       | 濃度(mg/L)         |
|-----------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|
| L-アラニン                      | 1.78~2.67       | イノシトール                   | 13.48~20.22      |
| L-アルギニン                     | 40~60           | ニコチン酸アミド                 | 1.8074~2.7111    |
| L-アルギニンHCl                  | 75.8~113.7      | ピリドキサルHCl                | 1.6~2.4          |
| L-アスパラギンH <sub>2</sub> O    | 13.002~19.503   | ピリドキシンHCl                | 0.2124~0.3186    |
| L-アスパラギン酸                   | 6.66~9.99       | リボフラビン                   | 0.2076~0.3114    |
| L-システインHCl・H <sub>2</sub> O | 7.024~10.536    | チアミンHCl                  | 1.868~2.802      |
| L-シスチン2HCl                  | 38.058~57.087   | ビタミンB <sub>12</sub>      | 0.273~0.4095     |
| L-グルタミン酸                    | 6.94~10.41      | ヒポキサンチン                  | 0.816~1.224      |
| L-グルタミン                     | 439.72~659.58   | リノール酸                    | 0.0168~0.0252    |
| グリシン                        | 15.5~23.25      | リボ酸(チオクト酸)               | 0.042~0.063      |
| L-ヒスチジン                     | 3~30            | プロレッシン二塩酸塩               | 0.0322~0.0483    |
| L-ヒドロキシプロリン                 | 4~6             | チミジン                     | 0.146~0.219      |
| L-イソロイシン                    | 52.748~79.122   | 塩化ナトリウム                  | 5279.8~7919.7    |
| L-ロイシン                      | 54.58~81.87     | 塩化カリウム                   | 284.72~427.08    |
| L-リジンHCl                    | 73.74~110.61    | 塩化カルシウム(無水)              | 86.644~129.966   |
| L-メチオニン                     | 15.896~23.844   | 硝酸カルシウム4H <sub>2</sub> O | 20~30            |
| L-フェニルアラニン                  | 30.392~45.588   | 塩化マグネシウム(無水)             | 11.444~17.166    |
| L-プロリン                      | 10.9~16.35      | 硫酸マグネシウム(無水)             | 48.844~73.266    |
| L-セリン                       | 24.9~37.35      | リン酸二水素ナトリウム(無水)          | 43.48~65.22      |
| L-スレオニン                     | 44.42~66.63     | リン酸一水素二ナトリウム(無水)         | 188.408~282.612  |
| L-トリプトファン                   | 7.808~11.712    | ブドウ糖(無水)                 | 1860.4~2790.6    |
| L-チロシン                      | 33.888~50.832   | ピルビン酸ナトリウム               | 0.001~220        |
| L-バリン                       | 43.86~65.79     | 硝酸第二鉄9H <sub>2</sub> O   | 0.04~0.06        |
| グルタチオン                      | 0.2~0.3         | 硫酸銅5H <sub>2</sub> O     | 0.0005~0.00075   |
| パラアミノ安息香酸                   | 0.2~0.3         | 硫酸第一鉄7H <sub>2</sub> O   | 0.1668~0.2502    |
| ビオチン                        | 0.04148~0.06222 | 硫酸亜鉛7H <sub>2</sub> O    | 0.1728~0.2592    |
| パントテン酸カルシウム                 | 1.746~2.619     | 亜セレン酸ナトリウム               | 0.000692~0.00348 |
| 塩化コリン                       | 4.992~7.488     | フェノールレッド                 | 5.248~7.872      |
| 葉酸                          | 2.06~3.09       |                          |                  |

に示される組成を有することを特徴とする、E S細胞培養用培地を調製するための基礎培地を提供する。

別の態様においては、本発明は、以下の表 I I :

5

表II

| 成分                          | 濃度(mg/L)        | 成分                        | 濃度(mg/L)        |
|-----------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| L-アラニン                      | 1.78~2.67       | 葉酸                        | 2.06~3.09       |
| L-アルギニン                     | 40~60           | イノシトール                    | 13.48~20.22     |
| L-アルギニンHCl                  | 75.8~113.7      | ニコチン酸アミド                  | 1.8074~2.7111   |
| L-アスパラギンH <sub>2</sub> O    | 13.002~19.503   | ピリドキサルHCl                 | 1.6~2.4         |
| L-アスパラギン酸                   | 6.66~9.99       | ピリドキシンHCl                 | 0.2124~0.3186   |
| L-システインHCl・H <sub>2</sub> O | 7.024~10.536    | リボフラビン                    | 0.2076~0.3114   |
| L-シスチン2HCl                  | 38.058~57.087   | チアミンHCl                   | 1.868~2.802     |
| L-グルタミン酸                    | 6.94~10.41      | ビタミンB <sub>12</sub>       | 0.273~0.4095    |
| L-グルタミン                     | 439.72~659.58   | ヒポキサンチン                   | 0.816~1.224     |
| グリシン                        | 15.5~23.25      | リノール酸                     | 0.0168~0.0252   |
| L-ヒスチジン                     | 3~30            | リポ酸(チオクト酸)                | 0.042~0.063     |
| L-ヒドロキシプロリン                 | 4~6             | プロレッシン二塩酸塩                | 0.0322~0.0483   |
| L-イソロイシン                    | 52.748~79.122   | チミジン                      | 0.146~0.219     |
| L-ロイシン                      | 54.58~81.87     | 塩化ナトリウム                   | 5279.8~7919.7   |
| L-リジンHCl                    | 73.74~110.61    | 塩化カリウム                    | 284.72~427.08   |
| L-メチオニン                     | 15.896~23.844   | 塩化カルシウム(無水)               | 86.644~129.966  |
| L-フェニルアラニン                  | 30.392~45.588   | 硝酸カルシウム4H <sub>2</sub> O* | 20~30           |
| L-プロリン                      | 10.9~16.35      | 塩化マグネシウム(無水)              | 11.444~17.166   |
| L-セリン                       | 24.9~37.35      | 硫酸マグネシウム(無水)              | 48.844~73.266   |
| L-スレオニン                     | 44.42~66.63     | リン酸二水素ナトリウム(無水)           | 43.48~65.22     |
| L-トリプトファン                   | 7.808~11.712    | リン酸一水素二ナトリウム(無水)          | 188.408~282.612 |
| L-チロシン                      | 33.888~50.832   | ブドウ糖(無水)                  | 1860.4~2790.6   |
| L-バリン                       | 43.86~65.79     | ピルビン酸ナトリウム                | 0.001~220       |
| グルタチオン                      | 0.2~0.3         | 硝酸第二鉄9H <sub>2</sub> O    | 0.04~0.06       |
| パラアミノ安息香酸                   | 0.2~0.3         | 硫酸銅5H <sub>2</sub> O      | 0.0005~0.00075  |
| ピオチン                        | 0.04148~0.06222 | 硫酸第一鉄7H <sub>2</sub> O    | 0.1668~0.2502   |
| パントテン酸カルシウム                 | 1.746~2.619     | 硫酸亜鉛7H <sub>2</sub> O     | 0.1728~0.2592   |
| 塩化コリン                       | 4.992~7.488     | フェノールレッド                  | 5.248~7.872     |

に示される組成を有することを特徴とする、E S細胞培養用培地を調製するための基礎培地を提供する。

また別の態様においては、本発明は、以下の表 I I I :

表III

| 成分                          | 濃度(mg/L)        | 成分                       | 濃度(mg/L)        |
|-----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| L-アラニン                      | 1.78~2.67       | 葉酸                       | 2.06~3.09       |
| L-アルギニン                     | 40~60           | イノシトール                   | 13.48~20.22     |
| L-アルギニンHCl                  | 75.8~113.7      | ニコチン酸アミド                 | 1.8074~2.7111   |
| L-アスパラギンH <sub>2</sub> O    | 13.002~19.503   | ピリドキサルHCl                | 1.6~2.4         |
| L-アスパラギン酸                   | 6.66~9.99       | ピリドキシンHCl                | 0.2124~0.3186   |
| L-システインHCl・H <sub>2</sub> O | 7.024~10.536    | リボフラビン                   | 0.2076~0.3114   |
| L-シスチン2HCl                  | 38.058~57.087   | チアミンHCl                  | 1.868~2.802     |
| L-グルタミン酸                    | 6.94~10.41      | ビタミンB <sub>12</sub>      | 0.273~0.4095    |
| L-グルタミン                     | 439.72~659.58   | ヒポキサンチン                  | 0.816~1.224     |
| グリシン                        | 15.5~23.25      | リノール酸                    | 0.0168~0.0252   |
| L-ヒスチジン                     | 3~30            | リボ酸(チオクト酸)               | 0.042~0.063     |
| L-ヒドロキシプロリン                 | 4~6             | プロレッシン二塩酸塩               | 0.0322~0.0483   |
| L-イソロイシン                    | 52.748~79.122   | チミジン                     | 0.146~0.219     |
| L-ロイシン                      | 54.58~81.87     | 塩化ナトリウム                  | 5279.8~7919.7   |
| L-リジンHCl                    | 73.74~110.61    | 塩化カリウム                   | 284.72~427.08   |
| L-メチオニン                     | 15.896~23.844   | 塩化カルシウム(無水)              | 86.644~129.966  |
| L-フェニルアラニン                  | 30.392~45.588   | 硝酸カルシウム4H <sub>2</sub> O | 20~30           |
| L-プロリン                      | 10.9~16.35      | 塩化マグネシウム(無水)             | 11.444~17.166   |
| L-セリン                       | 24.9~37.35      | 硫酸マグネシウム(無水)             | 48.844~73.266   |
| L-スレオニン                     | 44.42~66.63     | リン酸二水素ナトリウム(無水)          | 43.48~65.22     |
| L-トリプトファン                   | 7.808~11.712    | リン酸一水素二ナトリウム(無水)         | 188.408~282.612 |
| L-チロシン                      | 33.888~50.832   | ブドウ糖(無水)                 | 1860.4~2790.6   |
| L-バリン                       | 43.86~65.79     | 硝酸第二鉄9H <sub>2</sub> O   | 0.04~0.06       |
| グルタチオン                      | 0.2~0.3         | 硫酸銅5H <sub>2</sub> O     | 0.0005~0.00075  |
| パラアミノ安息香酸                   | 0.2~0.3         | 硫酸第一鉄7H <sub>2</sub> O   | 0.1668~0.2502   |
| ビオチン                        | 0.04148~0.06222 | 硫酸亜鉛7H <sub>2</sub> O    | 0.1728~0.2592   |
| パントテン酸カルシウム                 | 1.746~2.619     | フェノールレッド                 | 5.248~7.872     |
| 塩化コリン                       | 4.992~7.488     |                          |                 |

- 5 に示される組成を有することを特徴とする、E S細胞培養用培地を調製するための基礎培地を提供する。

別の態様においては、本発明の基礎培地は、2.5~4.5 g/LのHEPES、および所望のpHに調節するために必要な量のNaHCO<sub>3</sub>をさらに含む。

さらに別の態様においては、本発明は、本発明のES細胞培養用培地を用いることを特徴とするES細胞の培養方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

5 図1は、各種培地で培養したES-D3細胞におけるOct 3/4発現のフローサイトメトリ分析を示す。

図2は、ES-D3細胞の成長に及ぼすLIF濃度の影響を示す。

図3は、ESF7培地およびCEM培地で培養したES-D3細胞の増殖を示す。

10

#### 発明の詳細な説明

本発明においては、フィーダー細胞の非存在下で未分化マウスES細胞を成長させるための無血清合成培地を調製するための基礎培地が提供される。本発明の基礎培地（以下、ESF培地と称する）は、水に、上の表に示される各成分を所定の濃度となるように加え、さらに2.5～4.5 g/LのHEPES、および

15 所望のpHに調節するために必要な量のNaHCO<sub>3</sub>を加えた後、当該技術分野においてよく知られる方法を用いて滅菌することにより、容易に製造することができる。塩基性アミノ酸等の塩基性成分は、遊離塩基の形で加えても、HCl塩等の塩の形で加えてもよい。本発明の基礎培地に、6因子（6F；インスリン、

20 トランスフェリン、2-ME、2-エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、無脂肪酸ウシ血清アルブミンと複合体化したオレイン酸）およびLIF（白血病抑制因子）を補充して、本発明のES細胞培養用培地（以下、ESF7培地と称する）を製造する。これらの6因子およびLIFは市販されている。このESF7培地を用いることにより、ES細胞をタイプIコラーゲン被覆フラスコで無血

25 清条件下で維持することができる。あるいは、本発明のES細胞培養用培地は、市販の培地を適宜混合することにより製造してもよい。例えば、市販のRPMI、DMEMおよびF12を1：2：1の割合で混合し、HEPES、NaHCO<sub>3</sub>、ピルビン酸、亜セレン酸ナトリウムを添加して作成することにより簡便に製造することができるが、L-ヒスチジンHCl・H<sub>2</sub>Oの代わりに、L-ヒスチジン

を計 23.165 g/L 添加して使用する方が好ましい。

後述の実施例に示されるように、本発明にしたがって E S F 7 培地でマウス E S 細胞を培養すると、E S 細胞は、転写因子 O c t 3 / 4, 幹細胞マーカー S S E A - 1, およびアルカリホスファターゼの発現により表されるように、未分化の表現型を維持した。また、このようにして維持した未分化細胞に、骨形成因子 4 (BMP 4) を加えると上皮様細胞への分化が誘導された。また、アクチビン A を加えると、E S 細胞の線維芽細胞様細胞および棘状細胞への分化が促進された。すなわち、本発明にしたがって E S F 7 培地で培養した E S 細胞は、分化誘導因子の刺激により特定の細胞に分化する能力を維持していた。

- 10 本発明の基礎培地においては、L-アラニンの濃度は、1.78 mg/L~2.67 mg/L, 好ましくは 2.0025 mg/L~2.4475 mg/L, より好ましくは 2.11375 mg/L~2.33625 mg/L である。L-アルギニンの濃度は、40 mg/L~60 mg/L, 好ましくは 45 mg/L~55 mg/L, より好ましくは 47.5 mg/L~52.5 mg/L である。L-アルギニン HCl の濃度は、75.8 mg/L~113.7 mg/L, 好ましくは 85.275 mg/L~104.225 mg/L, より好ましくは 90.0125 mg/L~99.4875 mg/L である。
- 15 L-アスパラギン H<sub>2</sub>O の濃度は、13.002 mg/L~19.503 mg/L, 好ましくは 14.62725 mg/L~17.87775 mg/L, より好ましくは 15.43988 mg/L~17.06513 mg/L である。L-アスパラギン酸の濃度は、6.66 mg/L~9.99 mg/L, 好ましくは 7.4925 mg/L~9.1575 mg/L, より好ましくは 7.90875 mg/L~8.74125 mg/L
- 20 である。L-システイン HCl · H<sub>2</sub>O の濃度は、7.024 mg/L~10.536 mg/L, 好ましくは 7.902 mg/L~9.658 mg/L, より好ましくは 8.341 mg/L~9.219 mg/L である。L-シスチン 2 HCl の濃度は、38.058 mg/L~57.087 mg/L, 好ましくは 42.81525 mg/L~52.32975 mg/L, より好ましくは 45.19388 mg/L~49.95113 mg/L である。L-グルタミン酸の濃度は、6.94 mg/L~10.41 mg/L,
- 25 好ましくは 7.8075 mg/L~9.5425 mg/L, より好ましくは 8.24125 mg/L~9.10875 mg/L である。L-グルタミンの濃度は、439.72 mg/L~659.58 mg/L, 好ましくは 494.685 mg/L~604.615 mg/L, より好ましくは 522.1675 mg/L~577.1325 mg/L である。グリシンの濃度は、15.5 mg/L~23.25 mg/L, 好ましくは 17.4375 mg/L~21.3125 mg/L, より好ましくは 18.40625 mg/L~20.34375

- mg/L である。L-ヒスチジンの濃度は、3 mg/L～30 mg/L、好ましくは 20.8485 mg/L～25.4815 mg/L、より好ましくは 22.00675 mg/L～24.32325 mg/L である。L-ヒドロキシプロリンの濃度は、4 mg/L～6 mg/L、好ましくは 4.5 mg/L～5.5 mg/L、より好ましくは 4.75 mg/L～5.25 mg/L である。L-
- 5 イソロイシンの濃度は、52.748 mg/L～79.122 mg/L、好ましくは 59.3415 mg/L～72.5285 mg/L、より好ましくは 62.63825 mg/L～69.23175 mg/L である。L-ロイシンの濃度は、54.58 mg/L～81.87 mg/L、好ましくは 61.4025 mg/L～75.0475 mg/L、より好ましくは 64.81375 mg/L～71.63625 mg/L である。L-リジンHC 1 の濃度は、73.74 mg/L～110.61 mg/L、好ましくは 82.9575 mg/L
- 10 ～101.3925 mg/L、より好ましくは 87.56625 mg/L～96.78375 mg/L である。L-メチオニンの濃度は、15.896 mg/L～23.844 mg/L、好ましくは 17.883 mg/L～21.857 mg/L、より好ましくは 18.8765 mg/L～20.8635 mg/L である。L-フェニルアラニンの濃度は、30.392 mg/L～45.588 mg/L、好ましくは 34.191 mg/L～41.789 mg/L、より好ましくは 36.0905 mg/L～39.8895 mg/L である。
- 15 L-プロリンの濃度は、10.9 mg/L～16.35 mg/L、好ましくは 12.2625 mg/L～14.9875 mg/L、より好ましくは 12.94375 mg/L～14.30625 mg/L である。L-セリンの濃度は、24.9 mg/L～37.35 mg/L、好ましくは 28.0125 mg/L～34.2375 mg/L、より好ましくは 29.56875 mg/L～32.68125 mg/L である。L-スレオニンの濃度は、44.42 mg/L～66.63 mg/L、好ましくは 49.9725 mg/L～61.0775
- 20 mg/L、より好ましくは 52.74875 mg/L～58.30125 mg/L である。L-トリプトファンの濃度は、7.808 mg/L～11.712 mg/L、好ましくは 8.784 mg/L～10.736 mg/L、より好ましくは 9.272 mg/L～10.248 mg/L である。L-チロシンの濃度は、33.888 mg/L～50.832 mg/L、好ましくは 38.124 mg/L～46.596 mg/L、より好ましくは 40.242 mg/L～44.478 mg/L である。L-バリンの濃度は、43.86
- 25 mg/L～65.79 mg/L、好ましくは 49.3425 mg/L～60.3075 mg/L、より好ましくは 52.08375 mg/L～57.56625 mg/L である。

グルタチオンの濃度は、0.2 mg/L～0.3 mg/L、好ましくは 0.225 mg/L～0.275 mg/L、より好ましくは 0.2375 mg/L～0.2625 mg/L である。パラアミノ安息香酸の濃度は、0.2 mg/L～0.3 mg/L、好ましくは 0.225 mg/L～0.275 mg/L、より

- 好ましくは 0.2375 mg/L～0.2625 mg/L である。ビオチンの濃度は、0.04148 mg/L～0.06222 mg/L, 好ましくは 0.046665 mg/L～0.057035 mg/L, より好ましくは 0.049258 mg/L～0.054443 mg/L である。パントテン酸カルシウムの濃度は、1.746 mg/L～2.619 mg/L, 好ましくは 1.96425 mg/L～2.40075 mg/L,
- 5 より好ましくは 2.073375 mg/L～2.291625 mg/L である。塩化コリンの濃度は、4.992 mg/L～7.488 mg/L, 好ましくは 5.616 mg/L～6.864 mg/L, より好ましくは 5.928 mg/L～6.552 mg/L である。葉酸の濃度は、2.06 mg/L～3.09 mg/L, 好ましくは 2.3175 mg/L～2.8325 mg/L, より好ましくは 2.44625 mg/L～2.70375 mg/L である。イノシトールの濃度は、13.48 mg/L～20.22 mg/L, 好ましくは
- 10 15.165 mg/L～18.535 mg/L, より好ましくは 16.0075 mg/L～17.6925 mg/L である。ニコチン酸アミドの濃度は、1.8074 mg/L～2.7111 mg/L, 好ましくは 2.033325 mg/L～2.485175 mg/L, より好ましくは 2.146288 mg/L～2.372213 mg/L である。ピリドキサルHC 1 の濃度は、1.6 mg/L～2.4 mg/L, 好ましくは 1.8 mg/L～2.2 mg/L, より好ましくは 1.9 mg/L～2.1 mg/L である。ピリドキ
- 15 シンHC 1 の濃度は、0.2124 mg/L～0.3186 mg/L, 好ましくは 0.23895 mg/L～0.29205 mg/L, より好ましくは 0.252225 mg/L～0.278775 mg/L である。リボフラビンの濃度は、0.2076 mg/L～0.3114 mg/L, 好ましくは 0.23355 mg/L～0.28545 mg/L, より好ましくは 0.246525 mg/L～0.272475 mg/L である。チアミンHC 1 の濃度は、1.868 mg/L～2.802 mg/L, 好ましくは 2.1015 mg/L～
- 20 2.5685 mg/L, より好ましくは 2.21825 mg/L～2.45175 mg/L である。ビタミン B 1 2 の濃度は、0.273 mg/L～0.4095 mg/L, 好ましくは 0.307125 mg/L～0.375375 mg/L, より好ましくは 0.324188 mg/L～0.358313 mg/L である。ヒポキサンチンの濃度は、0.816 mg/L～1.224 mg/L, 好ましくは 0.918 mg/L～1.122 mg/L, より好ましくは 0.969 mg/L～1.071 mg/L である。リノール酸の濃
- 25 度は、0.0168 mg/L～0.0252 mg/L, 好ましくは 0.0189 mg/L～0.0231 mg/L, より好ましくは 0.01995 mg/L～0.02205 mg/L である。リボ酸（チオクト酸）の濃度は、0.042 mg/L～0.063 mg/L, 好ましくは 0.04725 mg/L～0.05775 mg/L, より好ましくは 0.049875 mg/L～0.055125 mg/L である。プロレッシン二塩酸塩の濃度は、0.0322 mg/L～0.0483 mg/L, 好ましくは 0.036225 mg/L～

0.044275 mg/L, より好ましくは 0.038238 mg/L~0.042263 mg/L である。チミジンの濃度は, 0.146 mg/L~0.219 mg/L, 好ましくは 0.16425 mg/L~0.20075 mg/L, より好ましくは 0.173375 mg/L~0.191625 mg/L である。

- 塩化ナトリウムの濃度は, 5279.8 mg/L~7919.7 mg/L, 好ましくは 5939.775 mg/L~7259.725 mg/L, より好ましくは 6269.763 mg/L~6929.738 mg/L である。塩化カリウムの濃度は, 284.72 mg/L~427.08 mg/L, 好ましくは 320.31 mg/L~391.49 mg/L, より好ましくは 338.105 mg/L~373.695 mg/L である。塩化カルシウム（無水）の濃度は, 86.644 mg/L~129.966 mg/L, 好ましくは 97.4745 mg/L~119.1355 mg/L, より好ましくは 102.8898 mg/L~113.7203 mg/L である。硝酸カルシウム 4 H<sub>2</sub>O の濃度は, 20 mg/L~30 mg/L, 好ましくは 22.5 mg/L~27.5 mg/L, より好ましくは 23.75 mg/L~26.25 mg/L である。塩化マグネシウム（無水）の濃度は, 11.444 mg/L~17.166 mg/L, 好ましくは 12.8745 mg/L~15.7355 mg/L, より好ましくは 13.58975 mg/L~15.02025 mg/L である。硫酸マグネシウム（無水）の濃度は, 48.844 mg/L~73.266 mg/L, 好ましくは 54.9495 mg/L~67.1605 mg/L, より好ましくは 58.00225 mg/L~64.10775 mg/L である。リン酸二水素ナトリウム（無水）の濃度は, 43.48 mg/L~65.22 mg/L, 好ましくは 48.915 mg/L~59.785 mg/L, より好ましくは 51.6325 mg/L~57.0675 mg/L である。リン酸一水素二ナトリウム（無水）の濃度は, 188.408 mg/L~282.612 mg/L, 好ましくは 211.959 mg/L~259.061 mg/L, より好ましくは 223.7345 mg/L~247.2855 mg/L である。ブドウ糖（無水）の濃度は, 1860.4 mg/L~2790.6 mg/L, 好ましくは 2092.95 mg/L~2558.05 mg/L, より好ましくは 2209.225 mg/L~2441.775 mg/L である。ピルビン酸ナトリウムの濃度は, 0.001 mg/L~220 mg/L, 好ましくは 50 mg/L~170 mg/L, より好ましくは 100 mg/L~120 mg/L である。ピルビン酸ナトリウムは, 基本培地中に含めず, 後に添加してもよい。硝酸第二鉄 9 H<sub>2</sub>O の濃度は, 0.04 mg/L~0.06 mg/L, 好ましくは 0.045 mg/L~0.055 mg/L, より好ましくは 0.0475 mg/L~0.0525 mg/L である。硫酸銅 5 H<sub>2</sub>O の濃度は, 0.0005 mg/L~0.00075 mg/L, 好ましくは 0.000563 mg/L~0.000688 mg/L, より好ましくは 0.000594 mg/L~0.000656 mg/L である。硫酸第一鉄 7 H<sub>2</sub>O の濃度は, 0.1668

- mg/L $\sim$ 0.2502 mg/L, 好ましくは 0.18765 mg/L $\sim$ 0.22935 mg/L, より好ましくは 0.198075 mg/L $\sim$ 0.218925 mg/L である。硫酸亜鉛 7 H<sub>2</sub>O の濃度は, 0.1728 mg/L $\sim$ 0.2592 mg/L, 好ましくは 0.1944 mg/L $\sim$ 0.2376 mg/L, より好ましくは 0.2052 mg/L $\sim$ 0.2268 mg/L である。亜セレン酸ナトリウムの濃度は, 0.000692 mg/L $\sim$ 0.00348 mg/L, 好ましくは 0.000779 mg/L $\sim$ 0.00291 mg/L, より好ましくは 0.000822 mg/L $\sim$ 0.00263 mg/L である。亜セレン酸ナトリウムは, 基本培地中に含めず, 後に添加してもよい。フェノールレッドの濃度は, 5.248 mg/L $\sim$ 7.872 mg/L, 好ましくは 5.904 mg/L $\sim$ 7.216 mg/L, より好ましくは 6.232 mg/L $\sim$ 6.888 mg/L である。
- 10 本発明の基礎培地に加える HEPES の濃度は, 2859.6 mg/L $\sim$ 4289.4 mg/L, 好ましくは 3217.05 mg/L $\sim$ 3931.95 mg/L, より好ましくは 3395.775 mg/L $\sim$ 3753.225 mg/L である。NaHCO<sub>3</sub> の濃度は, 1600 mg/L $\sim$ 2400 mg/L, 好ましくは 1800 mg/L $\sim$ 2200 mg/L, より好ましくは 1900 mg/L $\sim$ 2100 mg/L である。
- 15 本発明の ES 細胞培養用培地を用いることにより, フィーダー細胞を用いることなく, ES 細胞を未分化性を維持したまま成長させることができる。このため, 種々の因子が ES 細胞の分化に及ぼす影響を再現性をもって調べることができる。また, ES 細胞からの特定の細胞や臓器への分化条件を確立することがより容易になり, 予め規定された経路に沿って試験管内 (あるいは生体外で) で分化させるよう ES 細胞を誘導することが可能となる。したがって, 本発明の ES 細胞培養用培地は, 再生医療への応用に向けた ES 細胞の研究に有用である。
- 20 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また, 本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願 2003-434035 号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。
- 25

### 実施例

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが, これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

# 実施例 1

## 基礎培地の調製

- 以下の表に示される組成の基礎培地（E S F 培地と称する）を作成し、定法にしたがって滅菌した。
- 5

| 成分                          | 濃度(mg/L) | 成分                       | 濃度(mg/L) |
|-----------------------------|----------|--------------------------|----------|
| L-アラニン                      | 2.225    | ニコチン酸アミド                 | 2.25925  |
| L-アルギニン                     | 50       | ピリドキシルHCl                | 2        |
| L-アルギニンHCl                  | 94.75    | ピリドキシンHCl                | 0.2655   |
| L-アスパラギンH <sub>2</sub> O    | 16.2525  | リボフラビン                   | 0.2595   |
| L-アスパラギン酸                   | 8.325    | チアミンHCl                  | 2.335    |
| L-システインHCl・H <sub>2</sub> O | 8.78     | ビタミンB <sub>12</sub>      | 0.34125  |
| L-シスチン2HCl                  | 47.5725  | ヒポキサンチン                  | 1.02     |
| L-グルタミン酸                    | 8.675    | リノール酸                    | 0.021    |
| L-グルタミン                     | 549.65   | リポ酸(チオクト酸)               | 0.0525   |
| グリシン                        | 19.375   | プロレッシン二塩酸塩               | 0.04025  |
| L-ヒスチジン                     | 23.165   | チミジン                     | 0.1825   |
| L-ヒドロキシプロリン                 | 5        | 塩化ナトリウム                  | 6599.75  |
| L-イソロイシン                    | 65.935   | 塩化カリウム                   | 355.9    |
| L-ロイシン                      | 68.225   | 塩化カルシウム(無水)              | 108.305  |
| L-リジンHCl                    | 92.175   | 硝酸カルシウム4H <sub>2</sub> O | 25       |
| L-メチオニン                     | 19.87    | 塩化マグネシウム(無水)             | 14.305   |
| L-フェニルアラニン                  | 37.99    | 硫酸マグネシウム(無水)             | 61.055   |
| L-プロリン                      | 13.625   | リン酸二水素ナトリウム(無水)          | 54.35    |
| L-セリン                       | 31.125   | リン酸一水素二ナトリウム(無水)         | 235.51   |
| L-スレオニン                     | 55.525   | ブドウ糖(無水)                 | 2325.5   |
| L-トリプトファン                   | 9.76     | ピルビン酸ナトリウム               | 110      |
| L-チロシン                      | 42.36    | 硝酸第二鉄9H <sub>2</sub> O   | 0.05     |
| L-バリン                       | 54.825   | 硫酸銅5H <sub>2</sub> O     | 0.000625 |
| グルタチオン                      | 0.25     | 硫酸第一鉄7H <sub>2</sub> O   | 0.2085   |
| パラアミノ安息香酸                   | 0.25     | 硫酸亜鉛7H <sub>2</sub> O    | 0.216    |
| ビオチン                        | 0.05185  | 亜セレン酸ナトリウム               | 0.000865 |
| パントテン酸カルシウム                 | 2.1825   | フェノールレッド                 | 6.56     |
| 塩化コリン                       | 6.24     | HEPES                    | 3574.5   |
| 葉酸                          | 2.575    | NaHCO <sub>3</sub>       | 2000     |
| イノシトール                      | 16.85    |                          |          |

## 実施例 2

### ES細胞の培養および成長

- ES細胞株としては、ES-D3 (ATCC, USA) を用いた。この細胞は、フィーダー細胞なしで培養することができるが、その場合には分化傾向を示すと言われている。ES-D3細胞は、最初は、0.1%ゼラチン被覆プレート (Cell & Molecular Technologies, Inc., Phillipburg, NJ) で、15%ウシ胎児血清、L-グルタミン、0.1mM 2-メルカプトエタノール、ヌクレオシド、非必須アミノ酸、およびLIFを補充したダルベッコ改変イーグル培地 (Complete ES medium ; 以下CEMと称する、Cell & Molecular Technologies, Inc., Phillipburg, NJ) で維持した。CEM培地の組成を以下に示す。

**ES-101-B**  
Complete ES Cell Culture Media

| Part Number | Component                              |
|-------------|--|
| SLM-220     | DMEM ES cell qualified, 400 ml         |
| TMS-002     | L-Glutamine 8ml/400 ml media           |
| ES-008      | 4 ml nucleosides/400 ml media          |
| ES-007      | 4 ml beta-mercaptoethanol/400 ml media |
| TMS-001     | 4 ml NEAA/400 ml media                 |
| ES-009      | 60 ml FBS/400 ml media                 |
| LIF         | 4 ml LIF/400 ml media                  |
| TMS-AB2     | 4 ml Pen/Strep/400 ml media            |

| Base Catalog # | SLM-220 | Working pH range | 7.0 - 7.4 |
|----------------|---------|------------------|-----------|
|----------------|---------|------------------|-----------|

| Component  | mg/L  |
|--|-------|
| <b>INORGANIC SALTS</b>                               |       |
| CaCl <sub>2</sub> (anhyd.)                           | 200   |
| Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O | 0.1   |
| KCl  | 400   |
| MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)                           | 97.67 |
| NaCl   | 6400  |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 2250  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O   | 125   |
| <b>OTHER COMPONENTS</b>                              |       |
| D-Glucose  | 4500  |
| Phenol Red   | 15    |
| HEPES  | —     |
| Sodium Pyruvate                                      | —     |
| <b>VITAMINS</b>                                      |       |
| D-Ca pantothenate                                    | 4     |
| Chlorine Chloride                                    | 4     |
| Folic Acid   | 4     |
| D-Inositol   | 7.2   |
| Niacinamide  | 4     |
| Pyridoxal-HCl  | 4     |
| Pyridoxine-HCl                                       | —     |
| Riboflavin   | 0.4   |
| Thiamine-HCl   | 4     |

| Component                        | mg/L |
|----------------------------------|------|
| <b>AMINO ACIDS</b>               |      |
| L-Arginine-HCl                   | 84   |
| L-Cystine                        | —    |
| L-Cystine-2HCl                   | 63   |
| L-Glutamine                      | —    |
| Glycine                          | 30   |
| L-Histidine-HCl·H <sub>2</sub> O | 42   |
| L-Isoleucine                     | 105  |
| L-Leucine                        | 105  |
| L-Lysine-HCl                     | 146  |
| L-Methionine                     | 30   |
| L-Phenylalanine                  | 66   |
| L-Serine                         | 42   |
| L-Threonine                      | 95   |
| L-Tryptophan                     | 16   |
| L-Tyrosine                       | —    |
| L-Tyrosine-2Na-2H <sub>2</sub> O | 104  |
| L-Valine                         | 94   |

| Base Catalog # | ES-008 |
|----------------|--------|
|----------------|--------|

| Component | g/L  |
|-----------|------|
| Cytidine  | 0.73 |
| Guanosine | 0.85 |
| Uridine   | 0.73 |
| Adenosine | 0.8  |
| Thymidine | 0.24 |

75 cm<sup>2</sup>コーニング社プラスチックフラスコに0.15 mg/mlのコラーゲンタイプ I 溶液を10 ml 入れ, 乾燥させないように12時間処理し, 細胞播種直前に溶液を吸引除去した。ESF 培地に6因子 (10 μg/ml ウシインスリン, 5 μg/ml ヒトトランスフェリン, 10 μM 2-メルカプトエタノール, 10 μM 2-アミノエタノール, 10 nM 亜セレン酸ナトリウム, 4 μg

／m l 無脂肪酸ウシ血清アルブミンと複合体化したオレイン酸) ならびに 3 0 0 ユニット／m l の L I F (E S G R O (登録商標), Chemicon International Inc.) を添加した無血清培地 (E S F 7 培地) を調製した。継代時は、ダルベッコ氏リン酸緩衝液にて洗浄後, 0. 0 0 1 % トリプシン・0. 0 1 % E D T A に  
 5 て細胞を 1 0 秒から 3 0 秒処理後, ピペティングにて細胞を分散後, M C D B 1 5 3 溶液に溶解した 0. 1 % トリプシンインヒビターにてトリプシンを中和し, E S F 培地で細胞を集めて, 遠心後, 細胞を E S F 培地で分散, 再度, 遠心後, E S F 7 培地に細胞を分散させた。コラーゲン被覆フラスコに, E S F 7 培地中で E S - D 3 細胞を  $5 - 7 \times 10^3$  / m l の細胞密度で播種し, 数日間培養した  
 10 ところ, 接着性の弱い小型で境界が不明瞭でアルカリフォスファターゼ活性陽性の細胞群がコロニーを形成して増殖した。

未分化表現型の判定は以下のようにして行った。細胞のアルカリホスファターゼ活性を検出するために, 細胞を 4. 5 m M クエン酸, 2. 2 5 m M クエン酸ナトリウム, 3 m M 塩化ナトリウム, 6 5 % メタノールおよび 4 % パラホルムアル  
 15 デヒドで 5 分間固定し, 洗浄し, 次に F a s t R e d 基質キット (Nichirei Co., Tokyo, Japan) を用いて製造元の指針にしたがって, アルカリホスファターゼを可視化した。

O C T 3 / 4 蛋白質発現を検出するためには, 細胞を P B S 中 4 % パラホルムアルデヒド (P F A) で 4 ° C で 1 6 時間固定した。抗体とのインキュベートの前  
 20 に, 0. 0 0 2 % トリプシンを室温にて 5 分処理して細胞の透過性を増加させ, 切片をメタノール中 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 3 0 分間インキュベートすることにより内在性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。切片をマウス抗 O c t 3 / 4

(Transduction Laboratories, Lexington, KY) で免疫染色し, ペルオキシダーゼコンジュゲート化 S i m p l e S t a i n M A X P O (登録商標) ヤギ抗マ  
 25 ウス I g G (NICHIREI Corporation, Tokyo, Japan) および 3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾールで可視化した。

O c t 3 / 4 発現のフローサイトメトリ分析を行うためには, E S 細胞を, コラーゲンタイプ I で被覆した 9 0 m m プラスチックプレートで E S F 7 中で, および R D + 2 M E + F B S 中で, およびゼラチン被覆プラスチックプレートで C

EM中で、 $3 \times 10^5$ 細胞を播種した。培養第6日に、細胞をPBS中トリプシン／EDTAでトリプシン処理し、次に0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）中1%パラホルムアルデヒドで1時間固定した。細胞をPBS中1%サポニン（Sigma）中で室温で10分間処理して透過性を増加させた後、細胞を1mlの10%ヤギ血清（Nichirei）中に30分間懸濁し、遠心分離し、次に抗Oct3／4マウス抗体（Transduction Laboratories, Lexington, KY）とともに1時間インキュベートした。細胞を1%ヤギ血清を含有するPBSで3回洗浄し、次にフルオレセイン（FITC）-コンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG抗体（Immunotech, France）と30分間反応させた。細胞を1%ヤギ血清を含有するPBSで3回洗浄した。再懸濁した細胞をEpics A1tra（Beckman Coulter Co., Miami, FL）で分析した。

コラーゲン被覆フラスコでESF7培地中で5日間培養したES-D3細胞と、0.1%ゼラチン被覆フラスコでCEM中で5日間培養したES-D3細胞について、その細胞の形態を観察することにより表現型を比較した。ESF7培地中で成長したほとんどのES細胞は未分化のままであった。しかし、CEM中の培養物は、未分化細胞、線維芽細胞様細胞、上皮細胞様細胞および神経様細胞の混合物を含んでいた。ES細胞の未分化の性質は、通常は、幹細胞マーカー／Oct3／4に対する抗体で染色された細胞の比率を決定することにより確認される。免疫組織化学的染色により、ESF7培地中のほとんどのES-D3細胞はOct3／4蛋白質を発現していたが、CEM中ではより少ない細胞がOct3／4を発現していた。フローサイトメトリを用いて調べたところ、ESF7培地中の95%以上の細胞がOct3／4蛋白質を発現していたが、CEM中では85%未満の細胞がOct3／4を発現していた（図1）。15%FBSおよび2-メルカプトエタノールを添加したRD栄養培地中では、Oct3／4ポジティブ細胞のパーセンテージは60%未満であった。

### 実施例3

#### LIF濃度の影響

LIFがES-D3細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。ES-D3細胞をタイ

5 プ I コラーゲンで被覆した 24-ウエルプレートで E S F 6 (E S F + 6 因子) で、および RD + 6 F 中で、およびゼラチンで被覆した 24-ウエルプレートで DMEM + 15% FBS + 2-メルカプトエタノール中で、 $5 \times 10^3$  細胞/ウエルで播種した。L I F を各ウエルに 0, 1, 10, 100, 500, 1000 ユニット/ml で加えた。6 日間培養した後に細胞をコールターカウンターで計数した。

10 L I F は E S 細胞の自己複製能および未分化性を維持するが、細胞の増殖には影響を及ぼさないことが知られている。しかしながら、図 2 に示されるように、E S F 6 培地 (黒丸) においては、L I F は明らかに濃度依存的様式で E S 細胞増殖を刺激した。一方、15% FBS および 2-メルカプトエタノールを補充した DMEM (黒三角) 中では、L I F は細胞増殖にはほとんど影響を及ぼさなかった。すなわち、本発明の化学合成無血清 E S F 6 培地を用いることにより、L I F のマウス E S 細胞に対するこれまでに知られていない活性を識別することが可能となった。

15 E S F 7 培地から L I F を除いた場合にも、E S - D 3 細胞の自発的分化は認められなかった。L I F の非存在下で FBS を培地に加えると、E S - D 3 細胞は線維芽細胞様細胞、上皮様細胞、および神経様細胞に分化した。このことは、E S - D 3 細胞が E S F 6 培地中で未分化性を維持していたことを示す。

## 20 実施例 4

### E S 細胞の細胞増殖

E S - D 3 細胞を、タイプ I コラーゲンで被覆した 24-ウエルプレート (Falcon) に E S F 7 中で、およびゼラチンで被覆した 24 ウエルプレートに CEM 中で、 $1 \times 10^4$  細胞/ウエルで播種し、細胞増殖を比較した (図 3)。

25 E S - D 3 細胞は CEM 中でよく増殖した (黒三角; Td = 9 時間)。E S - D 3 細胞は E S F 7 培地中では CEM 中よりゆっくりと増殖したが (黒丸; Td = 11.8 時間), 第 6 日における細胞密度はいずれの培地についてもほとんど同じであった。E S - D 3 細胞を E S F 7 培地中で 1 年以上継続して培養しても、細胞はその形態を変化させず、アルカリホスファターゼ活性、Oct 3/4 およ

びSSEA-1を発現し続けた。

#### 実施例 5

##### ES 129SV細胞の培養

- 5 ES F7培地はES 129SV細胞の培養に及ぼす影響を調べた。10代継代目の凍結129/SVES細胞 (Cell & Molecular Technologies, Inc., Phillipburg, NJ) を購入し、これをフィーダー細胞上でCME中で維持した。129/SVES細胞をタイプIコラゲナーゼを含むPBS中でピペッティングし、ES F7培地 (2000ユニットのLIF/ml) でフィーダー細胞なしで
- 10 コラーゲン被覆フラスコに接種した。ES 129SV細胞はゆっくり増殖し、神経様細胞も出現した。しかし、アルカリホスファターゼ活性およびOct3/4抗体を用いる免疫組織学的発現の測定からES 129SV細胞がES F7培地中で分化することなく増殖したことがわかった。すなわち、本発明のES細胞培養用培地を用いることにより、通常はフィーダー細胞上で増殖するES細胞も
- 15 フィーダー細胞なしで増殖することが示された。ただし、継代時は、トリプシンEDTAではなく、0.3ユニット/mlのコラゲナーゼタイプI A-Sを用いて、細胞を分散させた。

#### 実施例 6

##### 20 BMP 4, アクチビンAならびにFGF-2による分化誘導

- ES-D3細胞を、ES F7中でラミニン被覆プラスチックプレートに接種し、2日間培養した。次に、培地をRD+5F培地 (5因子を補充したRD) に交換した。RD培地は非ES細胞タイプについて一般に用いられている無血清合成培地用の基本培地である。BMP 4の添加のためには、RD+5F培地に fatty
- 25 acid free-BSA を補充した。

アクチビンAをRD+5Fに加えると、ES-D3細胞の線維芽細胞様細胞への分化が誘導された。BMP 4を fatty acid free-BSA (無脂肪酸ウシ血清アルブミン) を補充したRD+5Fに加えると、ES細胞は上皮様細胞に分化した。これらの結果は、ES-D3細胞が成長因子に応答して、特定の経路に沿って分

- 化するよう誘導されうることを示す。ES-D3細胞を、ESF7中でラミニン被覆プラスチックプレートに接種し、2日間培養した。次に、培地をESF5に交換した。BMP4の添加のためには、ESF5に fatty acid free-BSA（無脂肪酸ウシ血清アルブミン）を補充した。あるいは、ES-D3細胞を、培地をESF5を用いて、ラミニン被覆プラスチックプレートに接種し、BMP4ならびに fatty acid free-BSA を添加して培養を行う。培地は2日毎に交換した。あるいは、ES-D3細胞を、培地をESF5を用いて、ラミニン被覆プラスチックプレートに接種し、FGF-2ならびにヘパリン、あるいは、FGF-2とヘパリンとNGF、あるいは、FGF-2とヘパリンとPDGF-AAを添加し、1日培養後、それぞれ増殖因子のみ添加し、さらに培養2日目に培地をESF5に培地交換し、培養を行った。培地は2日毎に交換した。

- アクチビンAをESF5に加えると、ES-D3細胞の線維芽細胞様細胞への分化が誘導された。BMP4を fatty acid free-BSA（無脂肪酸ウシ血清アルブミン）を補充したESF5に加えると、ES細胞は上皮様細胞に分化した。FGF-2とヘパリン、あるいはさらにNGF、あるいはPDGF-AAをESF5に加えると、神経様細胞に分化した。これらの結果は、ES-D3細胞が成長因子に応答して、特定の経路に沿って分化するよう誘導されうることを示す。

### 実施例7

#### 20 ES C57/BL6J ES細胞の培養

- ESF7培地が C57/BL6J ES細胞の培養に及ぼす影響を調べた。10代継代の凍結C57/BL6J ES細胞（Cell & Molecular Technologies, Inc., Phillipburg, NJ）を購入し、これをフィーダー細胞上でCME中で維持した。C57/BL6J ES細胞をPBSのみにて、あるいはタイプIコラーゲナーゼを含むPBS中でピペティングし、ESF7培地（3000ユニットのLIF/ml）でフィーダー細胞なしでコラーゲン被覆フラスコに接種した。C57/BL6J ES細胞は未分化なコロニーを作り、ゆっくり増殖した。すなわち、本発明のES細胞培養用培地を用いることにより、通常はフィーダー細胞上で増殖するES細胞もフィーダー細胞なしで増殖することが示された。

産業上の利用性

本発明にしたがう培地を用いることにより、フィーダー細胞なしで、未分化性を維持したままE S細胞を長期的に無血清培養することができるため、E S細胞の成長および分化誘導に有用である。

## 請求の範囲

1. 以下の表 I :

5

表I

| 成分                          | 濃度(mg/L)        | 成分                       | 濃度(mg/L)         |
|-----------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|
| L-アラニン                      | 1.78~2.67       | イノシトール                   | 13.48~20.22      |
| L-アルギニン                     | 40~60           | ニコチン酸アミド                 | 1.8074~2.7111    |
| L-アルギニンHCl                  | 75.8~113.7      | ピリドキサルHCl                | 1.6~2.4          |
| L-アスパラギンH <sub>2</sub> O    | 13.002~19.503   | ピリドキシンHCl                | 0.2124~0.3186    |
| L-アスパラギン酸                   | 6.66~9.99       | リボフラビン                   | 0.2076~0.3114    |
| L-システインHCl・H <sub>2</sub> O | 7.024~10.536    | チアミンHCl                  | 1.868~2.802      |
| L-シスチン2HCl                  | 38.058~57.087   | ビタミンB <sub>12</sub>      | 0.273~0.4095     |
| L-グルタミン酸                    | 6.94~10.41      | ヒポキサンチン                  | 0.816~1.224      |
| L-グルタミン                     | 439.72~659.58   | リノール酸                    | 0.0168~0.0252    |
| グリシン                        | 15.5~23.25      | リポ酸(チオクト酸)               | 0.042~0.063      |
| L-ヒスチジン                     | 3~30            | プロレッシン二塩酸塩               | 0.0322~0.0483    |
| L-ヒドロキシプロリン                 | 4~6             | チミジン                     | 0.146~0.219      |
| L-イソロイシン                    | 52.748~79.122   | 塩化ナトリウム                  | 5279.8~7919.7    |
| L-ロイシン                      | 54.58~81.87     | 塩化カリウム                   | 284.72~427.08    |
| L-リジンHCl                    | 73.74~110.61    | 塩化カルシウム(無水)              | 86.644~129.966   |
| L-メチオニン                     | 15.896~23.844   | 硝酸カルシウム4H <sub>2</sub> O | 20~30            |
| L-フェニルアラニン                  | 30.392~45.588   | 塩化マグネシウム(無水)             | 11.444~17.166    |
| L-プロリン                      | 10.9~16.35      | 硫酸マグネシウム(無水)             | 48.844~73.266    |
| L-セリン                       | 24.9~37.35      | リン酸二水素ナトリウム(無水)          | 43.48~65.22      |
| L-スレオニン                     | 44.42~66.63     | リン酸一水素二ナトリウム(無水)         | 188.408~282.612  |
| L-トリプトファン                   | 7.808~11.712    | ブドウ糖(無水)                 | 1860.4~2790.6    |
| L-チロシン                      | 33.888~50.832   | ピルビン酸ナトリウム               | 0.001~220        |
| L-バリン                       | 43.86~65.79     | 硝酸第二鉄9H <sub>2</sub> O   | 0.04~0.06        |
| グルタチオン                      | 0.2~0.3         | 硫酸銅5H <sub>2</sub> O     | 0.0005~0.00075   |
| パラアミノ安息香酸                   | 0.2~0.3         | 硫酸第一鉄7H <sub>2</sub> O   | 0.1668~0.2502    |
| ビオチン                        | 0.04148~0.06222 | 硫酸亜鉛7H <sub>2</sub> O    | 0.1728~0.2592    |
| パントテン酸カルシウム                 | 1.746~2.619     | 亜セレン酸ナトリウム               | 0.000692~0.00348 |
| 塩化コリン                       | 4.992~7.488     | フェノールレッド                 | 5.248~7.872      |
| 葉酸                          | 2.06~3.09       |                          |                  |

に示される組成を有することを特徴とする、E S細胞培養用培地を調製するため

の基礎培地。

2. 以下の表 I I :

表II

| 成分                          | 濃度(mg/L)        | 成分                       | 濃度(mg/L)        |
|-----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| L-アラニン                      | 1.78~2.67       | 葉酸                       | 2.06~3.09       |
| L-アルギニン                     | 40~60           | イノシトール                   | 13.48~20.22     |
| L-アルギニンHCl                  | 75.8~113.7      | ニコチン酸アミド                 | 1.8074~2.7111   |
| L-アスパラギンH <sub>2</sub> O    | 13.002~19.503   | ピリドキサルHCl                | 1.6~2.4         |
| L-アスパラギン酸                   | 6.66~9.99       | ピリドキシンHCl                | 0.2124~0.3186   |
| L-システインHCl・H <sub>2</sub> O | 7.024~10.536    | リボフラビン                   | 0.2076~0.3114   |
| L-シスチン2HCl                  | 38.058~57.087   | チアミンHCl                  | 1.868~2.802     |
| L-グルタミン酸                    | 6.94~10.41      | ビタミンB <sub>12</sub>      | 0.273~0.4095    |
| L-グルタミン                     | 439.72~659.58   | ヒポキサンチン                  | 0.816~1.224     |
| グリシン                        | 15.5~23.25      | リノール酸                    | 0.0168~0.0252   |
| L-ヒスチジン                     | 3~30            | リポ酸(チオクト酸)               | 0.042~0.063     |
| L-ヒドロキシプロリン                 | 4~6             | プロレッシン二塩酸塩               | 0.0322~0.0483   |
| L-イソロイシン                    | 52.748~79.122   | チミジン                     | 0.146~0.219     |
| L-ロイシン                      | 54.58~81.87     | 塩化ナトリウム                  | 5279.8~7919.7   |
| L-リジンHCl                    | 73.74~110.61    | 塩化カリウム                   | 284.72~427.08   |
| L-メチオニン                     | 15.896~23.844   | 塩化カルシウム(無水)              | 86.644~129.966  |
| L-フェニルアラニン                  | 30.392~45.588   | 硝酸カルシウム4H <sub>2</sub> O | 20~30           |
| L-プロリン                      | 10.9~16.35      | 塩化マグネシウム(無水)             | 11.444~17.166   |
| L-セリン                       | 24.9~37.35      | 硫酸マグネシウム(無水)             | 48.844~73.266   |
| L-スレオニン                     | 44.42~66.63     | リン酸二水素ナトリウム(無水)          | 43.48~65.22     |
| L-トリプトファン                   | 7.808~11.712    | リン酸一水素二ナトリウム(無水)         | 188.408~282.612 |
| L-チロシン                      | 33.888~50.832   | ブドウ糖(無水)                 | 1860.4~2790.6   |
| L-バリン                       | 43.86~65.79     | ピルビン酸ナトリウム               | 0.001~220       |
| グルタチオン                      | 0.2~0.3         | 硝酸第二鉄9H <sub>2</sub> O   | 0.04~0.06       |
| パラアミノ安息香酸                   | 0.2~0.3         | 硫酸銅5H <sub>2</sub> O     | 0.0005~0.00075  |
| ビオチン                        | 0.04148~0.06222 | 硫酸第一鉄7H <sub>2</sub> O   | 0.1668~0.2502   |
| パントテン酸カルシウム                 | 1.746~2.619     | 硫酸亜鉛7H <sub>2</sub> O    | 0.1728~0.2592   |
| 塩化コリン                       | 4.992~7.488     | フェノールレッド                 | 5.248~7.872     |

5

に示される組成を有することを特徴とする、E S細胞培養用培地を調製するための基礎培地。

## 3. 以下の表 I I I :

表III

| 成分                          | 濃度(mg/L)        | 成分                       | 濃度(mg/L)        |
|-----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| L-アラニン                      | 1.78~2.67       | 葉酸                       | 2.06~3.09       |
| L-アルギニン                     | 40~60           | イノシトール                   | 13.48~20.22     |
| L-アルギニンHCl                  | 75.8~113.7      | ニコチン酸アミド                 | 1.8074~2.7111   |
| L-アスパラギンH <sub>2</sub> O    | 13.002~19.503   | ピリドキサルHCl                | 1.6~2.4         |
| L-アスパラギン酸                   | 6.66~9.99       | ピリドキシンHCl                | 0.2124~0.3186   |
| L-システインHCl・H <sub>2</sub> O | 7.024~10.536    | リボフラビン                   | 0.2076~0.3114   |
| L-シスチン2HCl                  | 38.058~57.087   | チアミンHCl                  | 1.868~2.802     |
| L-グルタミン酸                    | 6.94~10.41      | ビタミンB <sub>12</sub>      | 0.273~0.4095    |
| L-グルタミン                     | 439.72~659.58   | ヒポキサンチン                  | 0.816~1.224     |
| グリシン                        | 15.5~23.25      | リノール酸                    | 0.0168~0.0252   |
| L-ヒスチジン                     | 3~30            | リポ酸(チオクト酸)               | 0.042~0.063     |
| L-ヒドロキシプロリン                 | 4~6             | プロレッシン二塩酸塩               | 0.0322~0.0483   |
| L-イソロイシン                    | 52.748~79.122   | チミジン                     | 0.146~0.219     |
| L-ロイシン                      | 54.58~81.87     | 塩化ナトリウム                  | 5279.8~7919.7   |
| L-リジンHCl                    | 73.74~110.61    | 塩化カリウム                   | 284.72~427.08   |
| L-メチオニン                     | 15.896~23.844   | 塩化カルシウム(無水)              | 86.644~129.966  |
| L-フェニルアラニン                  | 30.392~45.588   | 硝酸カルシウム4H <sub>2</sub> O | 20~30           |
| L-プロリン                      | 10.9~16.35      | 塩化マグネシウム(無水)             | 11.444~17.166   |
| L-セリン                       | 24.9~37.35      | 硫酸マグネシウム(無水)             | 48.844~73.266   |
| L-スレオニン                     | 44.42~66.63     | リン酸二水素ナトリウム(無水)          | 43.48~65.22     |
| L-トリプトファン                   | 7.808~11.712    | リン酸一水素二ナトリウム(無水)         | 188.408~282.612 |
| L-チロシン                      | 33.888~50.832   | ブドウ糖(無水)                 | 1860.4~2790.6   |
| L-バリン                       | 43.86~65.79     | 硝酸第二鉄9H <sub>2</sub> O   | 0.04~0.06       |
| グルタチオン                      | 0.2~0.3         | 硫酸銅5H <sub>2</sub> O     | 0.0005~0.00075  |
| パラアミノ安息香酸                   | 0.2~0.3         | 硫酸第一鉄7H <sub>2</sub> O   | 0.1668~0.2502   |
| ビオチン                        | 0.04148~0.06222 | 硫酸亜鉛7H <sub>2</sub> O    | 0.1728~0.2592   |
| パントテン酸カルシウム                 | 1.746~2.619     | フェノールレッド                 | 5.248~7.872     |
| 塩化コリン                       | 4.992~7.488     |                          |                 |

- 5 に示される組成を有することを特徴とする、E S細胞培養用培地を調製するための基礎培地。

4. 2. 5~4. 5 g/LのHEPES, および所望のpHに調節するために

必要な量の  $\text{NaHCO}_3$  をさらに含む、請求項 1 - 3 のいずれかに記載の基礎培地。

5. 請求項 4 記載の基礎培地、インスリン、トランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、無脂肪酸ウシ血清アルブミンと複合体化したオレイン酸、および L I F（白血病抑制因子）を含む、E S 細胞培養用培地。
6. 請求項 5 記載の E S 細胞培養用培地を用いることを特徴とする、E S 細胞の培養方法。

1/3

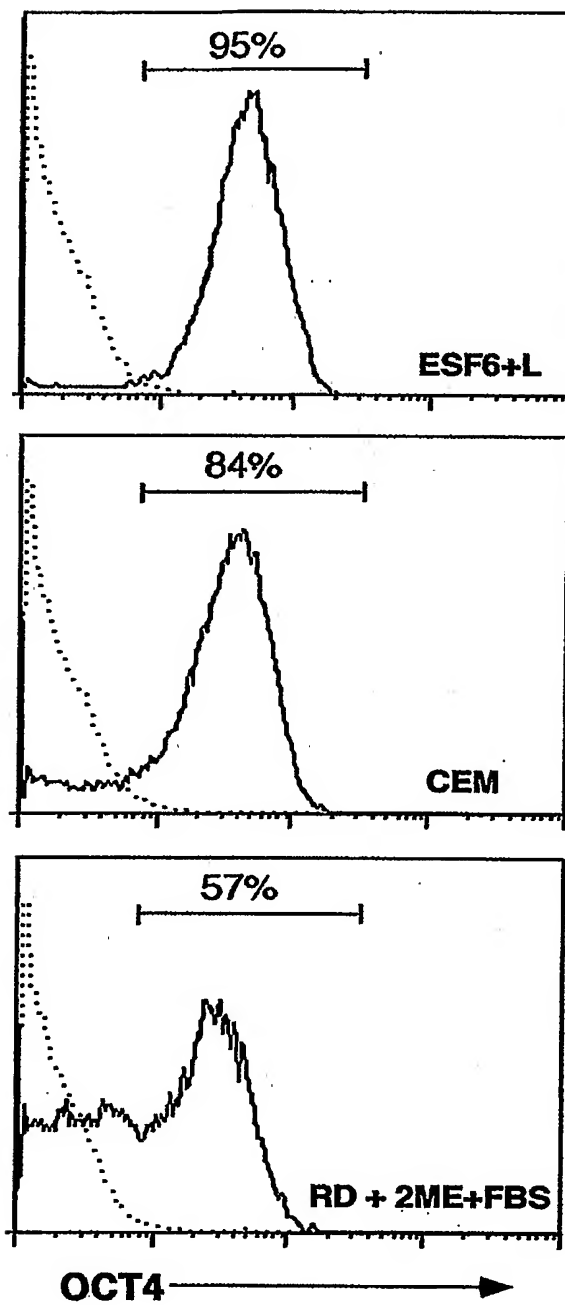


図 1

2/3

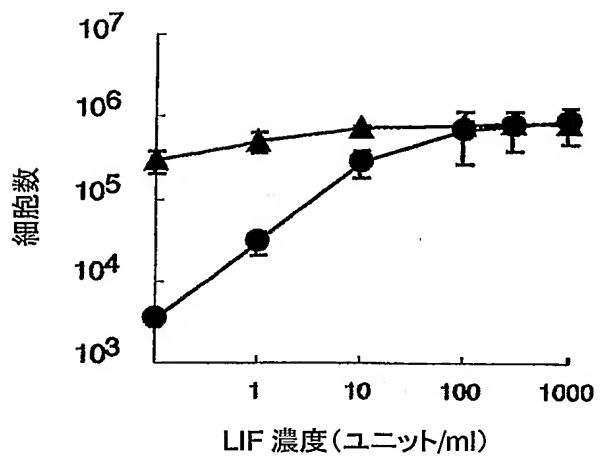


図 2

3/3

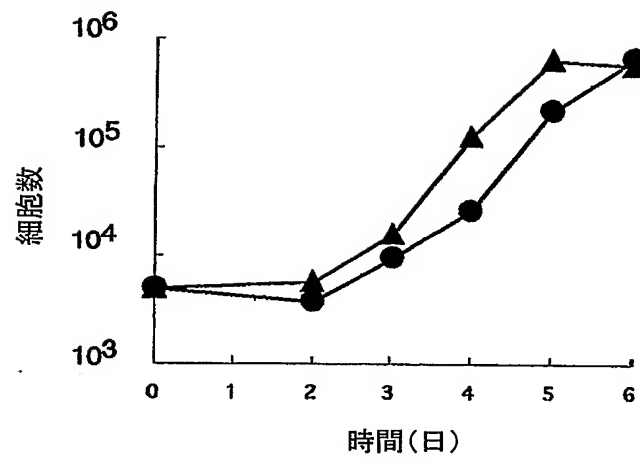


図 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/06, C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/06, C12N5/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTplus/JST7580 (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X<br>Y    | JP 2001-508302 A (Life Technologies, Inc.),<br>26 June, 2001 (26.06.01),<br>& WO 98/30679 A1 & AU 9857349 A<br>& EP 986635 A1 & US 2002/0076747 A1             | 1-4<br>5-6            |
| Y         | JP 9-505462 A (Baxter International, Inc.),<br>03 June, 1997 (03.06.97),<br>& WO 95/06112 A1 & AU 9476744 A<br>& EP 719326 A1 & SG 52619 A1<br>& IL 110755 A   | 5-6                   |
| A         | JP 2001-520036 A (Geron Corp.),<br>30 October, 2001 (30.10.01),<br>& WO 99/20741 A1 & AU 9912771 A<br>& EP 1025204 A1 & AU 200072356 A<br>& US 2003/0175956 A1 | 1-6                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 January, 2005 (21.01.05)

Date of mailing of the international search report  
08 February, 2005 (08.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019818

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | <p>JP 2003-111588 A (Geron Corp.),<br/> 15 April, 2003 (15.04.03),<br/> &amp; WO 2001/51616 A2                      &amp; AU 200111128 A<br/> &amp; AU 200126395 A                      &amp; US 2002/0019046 A1<br/> &amp; US 2002/0022268 A1                      &amp; US 2002/0072117 A1<br/> &amp; US 2002/0081724 A1                      &amp; US 2002/0090723 A1<br/> &amp; US 2002/0137204 A1                      &amp; US 2002/0151053 A1<br/> &amp; EP 1250420 A2                      &amp; US 2002/0168766 A1<br/> &amp; US 2003/0017589 A1                      &amp; JP 2003-111588 A<br/> &amp; CN 1416462 A                      &amp; AU 2002301213 A1<br/> &amp; US 2004/0235159 A1</p> | 1-6                   |

|  |  |                  |
|--|--|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  |  |                  |
| Int. Cl <sup>7</sup> C12N5/06, C12N5/08  |  |                  |
| B. 調査を行った分野  |  |                  |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))   |  |                  |
| Int. Cl <sup>7</sup> C12N5/06, C12N5/08  |  |                  |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの   |  |                  |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  |  |                  |
| BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)   |  |                  |
| C. 関連すると認められる文献  |  |                  |
| 引用文献の<br>カテゴリー*  | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| X/Y  | JP 2001-508302 A (ライフ テクノロジーズ, インコーポレイテッド) 2001. 06. 26<br>& WO 98/30679 A1 & AU 9857349 A & EP 986635 A1<br>& US 2002/0076747 A1          | 1-4/5-6          |
| Y  | JP 9-505462 A (バクスター, インターナショナル, インコーポレイテッド) 1997. 06. 03<br>& WO 95/06112 A1 & AU 9476744 A & EP 719326 A1<br>& SG 52619 A1 & IL 110755 A | 5-6              |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。  |  |                  |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |  |                  |
| 国際調査を完了した日   | 国際調査報告の発送日   |                  |
| 21. 01. 2005   | 08.02.2005   |                  |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号  | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>飯室 里美  | 4 B 2 9 3 6      |
|  | 電話番号 03-3581-1101  | 内線 3448          |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | JP 2001-520036 A (ジェロン・コーポレーション) 2001. 10. 30<br>& WO 99/20741 A1 & AU 9912771 A & EP 1025204 A1<br>& AU 200072356 A & US 2003/0175956 A1  | 1-6              |
| A                     | JP 2003-111588 A (ジェロン・コーポレーション) 2003. 04. 15<br>& WO 2001/51616 A2 & AU 200111128 A & AU 200126395 A<br>& US 2002/0019046 A1 & US 2002/0022268 A1<br>& US 2002/0072117 A1 & US 2002/0081724 A1<br>& US 2002/0090723 A1 & US 2002/0137204 A1<br>& US 2002/0151053 A1 & EP 1250420 A2 & US 2002/0168766 A1<br>& US 2003/0017589 A1 & JP 2003-111588 A & CN 1416462 A<br>& AU 2002301213 A1 & US 2004/0235159 A1 | 1-6              |